

WPI Acc No: 2001-283965/ 200130
 XRAM Acc No: C01-086705

Multimers of mutated major histocompatibility complex proteins, useful for isolating peptide-specific T lymphocytes for e.g. immunotherapy of cancer or virus infection

Patent Assignee: INSERM INST NAT SANTE & RECH MEDICALE (INRM)

Inventor: BODINIER M; BONNEVILLE M; DAVODEAU F; LANG F

Number of Countries: 095 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2798128	A1	20010309	FR 9911133	A	19990906	200130 B
WO 200118053	A1	20010315	WO 2000FR2443	A	20000905	200130
AU 200072981	A	20010410	AU 200072981	A	20000905	200137
EP 1127072	A1	20010829	EP 2000960796	A	20000905	200150
			WO 2000FR2443	A	20000905	
CN 1321167	A	20011107	CN 2000801877	A	20000905	200216

Priority Applications (No Type Date): FR 9911133 A 19990906

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

FR 2798128	A1	35		C07K-019/00	
------------	----	----	--	-------------	--

WO 200118053	A1 F			C07K-014/705	
--------------	------	--	--	--------------	--

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA
 CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP
 KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT
 RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR
 IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

AU 200072981	A			C07K-014/705	Based on patent WO 200118053
--------------	---	--	--	--------------	------------------------------

EP 1127072	A1 F			C07K-014/705	Based on patent WO 200118053
------------	------	--	--	--------------	------------------------------

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
 LI LT LU LV MC MK NL RO SI

CN 1321167	A			C07K-014/705	
------------	---	--	--	--------------	--

Abstract (Basic): FR 2798128 A1

Abstract (Basic):

NOVELTY - Multimers (I) constructed from recombinant proteins (II) analogous to Class I MHC (major histocompatibility complex) molecules in which (II) contain at least one alteration in the heavy chain region that interacts with the CD8 co-receptor on T lymphocytes, are new. The alteration reduces, or eliminates, interaction between the heavy chain and CD8.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(a) method for detecting peptide-specific CD8+ T cells in a polyclonal population by treatment with complexes (C) of (I) with antigenic peptides (III) and detecting cells that have become bound to (C);

(b) similar method for isolating peptide-specific CD8+ T cells in which (C) are attached to magnetic beads, optionally followed by in vitro amplification of the selected cells;

(c) T cell populations selected by methods (a) and (b); and

(d) pharmaceutical, especially immunotherapeutic, composition, containing the population of (c) and an inert vehicle.

ACTIVITY - Antitumor; antiviral; immunomodulatory.

USE - Complexes (C) of (I) and antigenic peptides (III) are used to detect and isolate peptide-specific CD8+ T cells for subsequent in

vitro expansion and then use as antitumor and antiviral agents by passive immunization, also for correction of diseases of the immune system and use in immunofluorescent analysis.

ADVANTAGE - Mutated (I) recognize target cells as effectively as the wild-type (I), i.e. binding to CD8 alone is reduced but not binding to the T cell receptor (TCR)/CD8 complex. This results in a significant reduction in background noise caused by non-specific binding and eliminates the need for simultaneous use of labeled anti-CD8 antibody during fluorescent analysis. The HLA-A021 tetramer, either native (1) or with the Ala245Val mutation (2) was loaded with a peptide derived from the cytomegalovirus pp65 protein, and tested for immunofluorescent analysis (phycoerythrin label) of polyclonal lymphocytes from two patients having a confirmed anti-pp65 response. (1) was able to detect peptide-specific cells easily in one subject but not in the other where the peak was subject to interference from non-specific binding, and accurate detection necessitated double labeling (use of labeled anti-CD8 antibody). With (2) accurate detection of specific cells was possible in both patients, without use of the anti-CD8 antibody.

pp; 35 DwgNo 0/7

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 798 128**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **99 11133**

⑤① Int Cl⁷ : C 07 K 19/00, C 07 K 14/47, C 12 N 5/08, A 61 K 35/
14, A 61 P 37/04, G 01 N 33/53

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②② Date de dépôt : 06.09.99.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.03.01 Bulletin 01/10.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-
sement public à caractère scientifique et technologique*
— FR.

⑦② Inventeur(s) : LANG FRANCOIS, BODINIER MARIE,
DAVODEAU FRANCOIS et BONNEVILLE MARC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : ARMENGAUD AINE.

⑤④ **MOYENS DE DETECTION ET DE PURIFICATION DE POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T CD8+ SPECIFIQUES DE PEPTIDES PRESENTES DANS LE CONTEXTE HLA.**

⑤⑦ L'invention vise des multimères élaborés à partir de protéines recombinantes analogues de CMH de classe I, caractérisés en ce que les protéines comportent au moins une altération dans la zone d'interaction d'une chaîne lourde avec le co-récepteur CD8 des lymphocytes T conduisant à une réduction, voire à la suppression de l'affinité de l'interaction entre la chaîne lourde et le CD8. Applications de ces multimères complexés à des peptides antigéniques à des fins diagnostiques et thérapeutiques.

FR 2 798 128 - A1



5 Moyens de détection et de purification de
populations lymphocytaires TCD8+, spécifiques de peptides
présentés dans le contexte HLA

L'invention a pour objet des moyens de détection et
10 de purification de populations lymphocytaires TCD8+,
spécifiques de peptides présentés dans le contexte HLA.

Le lymphocyte T porte un récepteur spécifique de
l'antigène contre lequel il est commis, appelé TCR. Ce TCR
15 est composé de plusieurs chaînes, dont les chaînes α et β qui
sont impliquées dans la reconnaissance spécifique d'un
peptide antigénique particulier présenté dans une molécule
HLA. Cette reconnaissance se matérialise par la capacité du
TCR α/β du lymphocyte T à se fixer avec une certaine
20 affinité aux complexes HLA-peptide présents à la surface de
la cellule cible. Réciproquement, des complexes HLA-peptide
solubles sont capables de se fixer aux TCR présents à la
surface des lymphocytes T spécifiques du complexe HLA-peptide
considéré.

25
A l'heure actuelle, le système le mieux étudié
moléculairement est la reconnaissance par des lymphocytes T
CD8+ de peptides antigéniques présentés dans des molécules du
complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et en
30 particulier dans l'allèle HLA-A0201.

5 Dans ce système, il est établi que l'affinité du
TCR pour le complexe HLA-peptide est très faible comparée à
l'affinité d'un anticorps pour son antigène. Pour cette
raison, la détection de lymphocytes porteurs de TCR réactifs
contre un peptide spécifique dans ce contexte HLA à l'aide de
10 molécules HLA-A0201 solubles chargées en peptides et marquées
est impossible. Pour pallier cette faible affinité, Altman et
al (1) ont fabriqué un réactif multivalent composé de
complexes HLA-A0201-peptide où la chaîne lourde du HLA est
biotinylée, ce qui permet une association en tétramère avec
15 la streptavidine. Ce tétramère HLA-peptide présente une
avidité augmentée pour les lymphocytes T porteurs des TCR
appropriés et peut donc être utilisé pour visualiser par
immunofluorescence les populations réactives.

 Mais le TCR n'est pas la seule molécule du
20 lymphocyte T qui puisse interagir avec le complexe HLA-
peptide. En effet, lors de la reconnaissance physiologique,
la fixation du TCR au complexe CMH-peptide est renforcée par
la fixation du co-récepteur CD8 à une portion constante des
molécules CMH de classe I. La participation du CD8 dans
25 l'interaction est variable d'un clone lymphocytaire à l'autre
et peut dans certains cas conduire à une augmentation très
importante de la capacité de fixation à un complexe HLA-
peptide donné. Cette capacité du CD8 à se fixer au HLA de
classe I a pour conséquence d'entraîner un bruit de fond de
30 fixation des tétramères HLA de classe I sur des lymphocytes T
CD8+ qui portent des TCR non spécifiques du complexe HLA-
peptide. Ce bruit de fond augmente avec la concentration de
tétramère utilisée et peut conduire à des faux positifs en

5 immunofluorescence. Pour essayer de diminuer ce marquage non
spécifique, la plupart des équipes réalisent leurs marquages
avec les tétramères HLA de classe I en présence d'anticorps
anti-CD8. Mais seuls certains anticorps anti-CD8 sont
efficaces et les rapports optimaux de concentrations entre
10 l'anticorps et le tétramère doivent être réajustés à chaque
test. Du fait de ces inconvénients, la détection de sous-
populations spécifiques peu représentées au sein d'une
population non spécifique (par exemple de l'ordre de 0,1 à 1
%) devient difficile.

15

Par ailleurs, une autre application potentielle des
tétramères HLA a été envisagée. Elle consiste à isoler par
tri (en cytométrie de flux ou par tri immunomagnétique) des
populations lymphocytaires réactives contre un complexe HLA-
20 peptide donné à des fins d'expansion *in vitro*, puis
d'utilisation thérapeutique dans des protocoles
d'immunisation passive anti-virale ou anti-tumorale. Mais le
bruit de fond de fixation du tétramère dû à la participation
du CD8 peut constituer un obstacle sérieux à cette
25 application car il conduit à l'isolement d'une fraction
souvent importante de lymphocytes T non réactifs vis-à-vis du
complexe HLA-peptide sélectionnant.

Salter et al (2) ont montré que la fixation d'un
30 HLA membranaire exprimé par des cellules transfectées à un
co-récepteur CD8 $\alpha\alpha$ était altérée lorsque le HLA comportait
une mutation dans le domaine $\alpha 3$.

5 L'étude de telles mutations par les inventeurs les
a conduits à vérifier que des tétramères mutés solubles
fixent effectivement moins le CD8, qu'il soit $\alpha\alpha$ ou $\alpha\beta$,
associé ou non à un TCR à la surface du lymphocyte T, ce qui
se traduit par une diminution du bruit de fond.

10 On pouvait alors s'attendre à ce que la perte
d'affinité résultant de la mutation conduise à une perte de
signal spécifique totale ou restreinte à certains clones
lymphocytaires T CD8 dépendants. L'article de Salter et al
montre à cet égard que certains clones alloréactifs CD8
15 dépendants perdent leur cytotoxicité vis-à-vis de cellules
portant le HLA-A2 muté tandis que d'autres sont peu affectés.

Ainsi il aurait été possible que les tétramères
mutés ne détectent qu'une fraction des cellules réactives
(les moins CD8 dépendantes) au sein d'une population
20 polyclonale.

Les nombreux marquages comparatifs de populations
polyclonales avec les tétramères mutés et natifs réalisés par
les inventeurs en double marquage avec un anticorps anti-CD8
démontrent qu'au contraire, de manière inattendue, le
25 tétramère muté reconnaît le même pourcentage de cellules
spécifiques que le tétramère natif.

De plus, la comparaison de marquage avec le
tétramère muté sur un clone très CD8 dépendant et un clone
peu CD8 dépendant montre une efficacité comparable de
30 fixation du tétramère rapportée à l'intensité d'expression du
TCR.

5 Il apparaît donc que la mutation diminue de façon très importante la fixation du tétramère au CD8 seul, mais affecte beaucoup moins sa fixation au complexe TCR-CD8.

L'invention repose donc sur la mise à profit des propriétés mises en évidence chez les multimères de HLA
10 mutés, ou, de manière plus générale, altérés, et vise, en tant que nouveaux produits, de tels multimères et leurs complexes avec des peptides antigéniques.

Elle vise également l'utilisation de ces molécules pour la détection et/ou l'isolement de populations
15 lymphocytaires TCD8+, peptide-spécifiques.

Elle vise en outre à fournir une méthode de détection et/ou d'isolement de telles populations à l'aide de telles molécules, chargées en peptide, en particulier pour des applications en diagnostic et en thérapeutique.

20 Les multimères selon l'invention sont élaborés à partir de protéines recombinantes analogues de CMH de classe I et sont caractérisés en ce que les protéines comportent au moins une altération dans la zone d'interaction d'une chaîne lourde de CMH de classe I avec le co-récepteur CD8 des
25 lymphocytes T, conduisant à une réduction, voire à la suppression de l'affinité de l'interaction entre la chaîne lourde et le CD8.

L'altération de la zone d'interaction concerne plus spécialement le domaine $\alpha 3$ de la chaîne lourde.

30 Il s'agit tout particulièrement d'une mutation dans le domaine $\alpha 3$ d'au moins un acide aminé, par rapport au domaine correspondant d'une chaîne lourde native capable de se fixer audit co-récepteur CD8.

5 On citera par exemple la mutation d'un résidu alanine en résidu valine en position 245 du domaine $\alpha 3$ de la molécule HLA-A2.

 L'altération peut également consister en une modification chimique d'au moins un acide aminé et/ou en une
10 délétion d'au moins un acide aminé, ce ou ces types d'altération s'ajoutant le cas échéant à une ou plusieurs mutations.

 L'invention vise également, en tant que nouveaux produits, les complexes élaborés à partir des multimères
15 définis ci-dessus et de peptides antigéniques.

 Dans ces complexes, les multimères se présentent notamment sous forme de tétramères.

 Conformément à l'invention, ces complexes sont utilisés pour la détection et/ou l'isolement de populations
20 lymphocytaires TCD8+ reconnaissant de manière spécifique le peptide antigénique des complexes.

 L'utilisation des complexes définis ci-dessus permet de diminuer de façon très importante le bruit de fond
25 de fixation non spécifique sans altérer le marquage spécifique et, en outre, de s'affranchir de la nécessité d'utiliser conjointement un anticorps anti-CD8 lors d'analyses en immunofluorescence.

 Dans une utilisation préférée, lesdits complexes
30 sont mis en oeuvre dans un procédé de tri cellulaire, tel que le tri immunomagnétique.

5 Une technique de tri immunomagnétique pour isoler des lymphocytes T spécifiques chez la souris est décrite par Luxembourg et al. (5).

 Cette technique est basée sur l'utilisation d'un système de billes recouvertes de complexes CMH-peptide
10 (produits dans un système Drosophile ; chargés en peptides et biotinylés chimiquement).

 L'invention vise également une méthode de détection et/ou d'isolement de populations lymphocytaires T CD8+ peptide-spécifiques, à partir d'une population polyclonale.
15 La méthode de détection est caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact de la population polyclonale avec des multimères complexés à des peptides antigéniques tels que définis ci-dessus, dans des conditions permettant une
20 interaction entre les complexes de CMH de classe I altérés/peptides et les récepteurs des lymphocytes T ayant une affinité pour lesdits complexes,

- la révélation des populations lymphocytaires qui se sont fixées auxdits complexes.

25 La révélation est réalisée par exemple par fluorescence en utilisant des multimères comportant des composés fluorescents.

 La méthode d'isolement des populations lymphocytaires peptide-spécifiques à partir de populations polyclonales entre également dans le cadre de l'invention et
30 peut être mise en oeuvre le cas échéant après l'étape de détection ci-dessus.

5 Cette méthode met en jeu la technique du tri immunomagnétique et est caractérisée en ce que qu'elle comprend :

- la mise en contact de la population polyclonale avec des billes magnétiques sur lesquelles sont fixées les
10 complexes peptide/analogues de CMH de classe I, tels que définis ci-dessus, dans des conditions permettant une interaction entre lesdits complexes et les récepteurs des lymphocytes T ayant une affinité pour ces complexes,
- la récupération des populations fixées,
15 l'opération de tri étant répétée, si souhaité, et/ou suivie, le cas échéant, d'une étape
- d'amplification *in vitro* des populations sélectionnées.

 L'augmentation du différentiel entre bruit de fond
20 et marquage spécifique avec les multimères altérés comme défini ci-dessus permet une meilleure discrimination des populations lymphocytaires spécifiques au sein d'une population polyclonale, et rend ainsi très efficace le tri immunomagnétique avec ces multimères.

25 Les molécules de CMH comprennent par exemple un motif de biotinylation enzymatique sur la chaîne lourde. Les billes sur lesquelles sont fixées les complexes sont couplées à la streptavidine.

 Les populations polyclonales proviennent
30 d'échantillons prélevés sur des patients, comme des liquides synoviaux ou des cellules mononuclées du sang périphérique.

 L'étape d'amplification des populations sélectionnées est réalisée avantageusement par stimulation

5 polyclonale dans des conditions qui n'affectent pas la représentativité des populations amplifiées. On a recours par exemple à PHA, IL2 ou des PBL irradiés.

L'invention vise également les populations lymphocytaires T sélectionnées et le cas échéant amplifiées,
10 caractérisées en ce qu'elles sont exclusivement constituées de lymphocytes T réactifs vis-à-vis du peptide d'un complexe donné.

De telles populations peptide-spécifiques revêtent un grand intérêt en thérapeutique, et plus spécialement pour
15 les applications qui reposent sur leur ré-administration selon l'immunothérapie adoptive.

L'invention vise donc des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles sont élaborées à partir d'une population lymphocytaire T peptide-spécifique
20 telle que définie ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutique.

De telles compositions sont avantageusement administrables par injection.

Il est ainsi possible de restaurer une immunité
25 antivirale ou antitumorale après injection de lymphocytes T reconnaissant respectivement un complexe CMH de classe I/ peptide viral ou tumoral défini, ou de corriger un déséquilibre immunitaire (par exemple cas d'autoimmunité,) par l'administration de cellules T dirigées contre un
30 antigène donné et présentant des propriétés activatrices ou inhibitrices de la réponse immunitaire.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention figurent dans les exemples qui suivent, donnés à

- 5 titre purement illustratif, dans lesquels il est fait
référence aux figures 1 à 7, qui représentent, respectivement
- les figures 1 et 2 représentent les intensités de
fluorescence (moyennes) en fonction des concentrations en
tétramères natifs (1A, 2A) et en tétramères mutés
10 correspondants (1B, 2B) avec des tétramères chargés en
peptide issu de BMLF1 (fig.1) ou de pp65 (fig. 2),
 - la figure 3, les moyennes d'intensité de
fluorescence en fonction des concentrations en tétramères
natifs et mutés avec des clones spécifiques,
 - 15 - la figure 4A, le pourcentage de lyse, avec ou
sans anticorps anti-CD8 de 2 clones spécifiques d'une lignée
B HLA-A0201 chargée avec un peptide BMLF1 et les figures 4A
et 4B, les résultats des marquages de ces clones,
 - la figure 5, les résultats de simples (avec le
20 phycoérythrine, PE) et doubles (PE et anticorps anti-CD8
marqués) marquages de tétramères natifs et mutés avec les
lymphocytes de 2 patients, et
 - les figures 6 et 7, les résultats de tris
immunomagnétiques réalisés avec des tétramères natifs et des
25 tétramères mutés.

Exemple 1 : Fabrication d'un tétramère HLA-A0201
muté dans la zone d'interaction avec le co-récepteur CD8.

On a utilisé un plasmide d'expression en bactérie
30 contenant l'ADNc codant pour la chaîne lourde du HLA0201,
prolongé d'une séquence codant pour un motif de biotinylation
enzymatique (construction selon Altman et al (1). La zone

5 codant pour le domaine $\alpha 3$ a été amplifiée avec des amorces
spécifiques SEQ ID N°1

5' CCTTCCAGAAGTGGGTGGCTGTGGTGGTGCC 3'

et SEQ ID N°2

10 5' GGCACCACCACAGCCACCCACTTCTGGAAGG 3'

On a introduit dans les fragments d'amplification
une mutation d'une base pour transformer le codon alanine en
un codon valine en utilisant le kit QuickChange Site-directed
15 Mutagenesis R de Stratagène.

Le fragment muté a été réintroduit dans le plasmide
d'expression et la présence de la mutation a été contrôlée
par séquençage.

La chaîne lourde HLA-A0201 mutée a été produite en
20 corps d'inclusion bactérien et le monomère HLA chargé en
peptide, puis le tétramère muté correspondant, ont pu être
obtenus suivant un protocole de renaturation précédemment
décrit par Garboczi et al (3).

25 Exemple 2 : Etude comparative de l'efficacité et de
la spécificité de marquage immunofluorescent entre un
tétramère HLA-A0201 natif et le tétramère HLA-A0201 muté
chargés avec différents peptides

30 a) Marquage de clones lymphocytaires

Des tétramères HLA-A0201 natifs et des tétramères
correspondants mutés ont été chargés soit avec un peptide

5 issu de la protéine BMLF1 du virus de l'EBV, soit avec un peptide issu de la protéine pp65 du CMV.

Les tétramères natifs sont obtenus selon la technique de l'exemple 1, mais sans la mutation.

Des clones spécifiques et non spécifiques ont été
10 marqués et utilisés à des concentrations croissantes.

La figure 1 donne les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) obtenues avec les tétramères HLA-A2/BMLF1 natifs (figure 1A) et avec les tétramères correspondants mutés (figure 1B).

15 On constate que le tétramère HLA-A2/BM natif montre un bruit de fond de fixation sur certains clones non spécifiques qui augmente avec la dose de tétramère utilisée.

Ce bruit de fond ne semble pas exclusivement lié à la restriction HLA du clone considéré, mais dépend aussi du
20 peptide chargé puisque deux clones anti-IE1 restreints HLA-A0201 donnent un fort bruit de fond, alors que le clone anti-melan-A également restreint HLA-A0201 donne un bruit de fond modéré.

Avec le tétramère muté, les moyennes de
25 fluorescence (MFI) obtenues sur les clones spécifiques (BM/A2) sont plus faibles que celles obtenues avec le tétramère natif, mais le bruit de fond sur les clones non spécifiques est quasiment nul et ceci quelle que soit la concentration de tétramère utilisée.

30 On remarquera que cette différence de bruit de fond entre le tétramère natif et le tétramère muté n'est pas particulière au tétramère A2/BM puisqu'on l'observe également avec le tétramère HLA-A2/pp65 (voir figure 2).

5 Dans cette figure 2, la moyenne de fluorescence est indiquée en échelle log afin de visualiser les faibles bruit de fond de marquage obtenu avec le tétramère muté. On constate que le différentiel entre le marquage spécifique et le marquage non spécifique est de l'ordre de $2 \log (10^2)$ avec
10 le tétramère A2/pp65 muté, alors qu'il est de seulement 1 log avec le tétramère natif. Les deux exceptions notables sont les deux clones CD4 anti-EBV pour lesquels le bruit de fond est très faible avec le tétramère natif. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle le bruit de fond de
15 marquage obtenu avec le tétramère natif est dû à un certain pourcentage de fixation non spécifique du tétramère au CD8.

Sur la figure 3, sont représentées les différences de marquages obtenues avec les tétramères mutés et natifs chargés avec pp65 sur des clones spécifiques. La différence
20 entre les courbes de saturation obtenues avec le tétramère muté et le tétramère natif montre qu'il existe un plus grand nombre de sites de fixation pour le tétramère natif que pour le tétramère muté sur ces clones : il est donc fortement probable que, dans le cas du tétramère natif, certaines
25 valences interagissent avec le CD8 seul, d'autant que cette molécule est exprimée à une densité largement supérieure à celle du TCR à la surface du lymphocyte T.

D'autres expériences ont été réalisées pour tester si le marquage spécifique avec le tétramère muté était
30 significativement affecté par le degré de CD8 dépendance de clones spécifiques. En effet, il est notoire que parmi les clones T CD8+, certains clones ont fortement besoin du CD8 pour renforcer l'interaction spécifique entre leur TCR et le

5 complexe HLAA-peptide, tandis que d'autres clones s'en dispensent.

Le degré de CD8 dépendance a été estimé selon le test de cytotoxicité de Couedel et al (4) avec ou sans anticorps anti-CD8 et est considéré comme inversement
10 proportionnel à l'affinité du TCR pour le complexe HLA-peptide.

Sur la figure 4A, est représenté un test de cytotoxicité contre une lignée HLA-A0201 chargée en peptide BMLF1 (10 μ M) avec deux clones spécifiques. Le clone A2.10 est
15 très CD8 dépendant puisque sa cytotoxicité est abrogée par l'anticorps anti-CD8, tandis que le clone A4.5 est relativement peu CD8 dépendant.

Un marquage avec le tétramère muté et un marquage avec un anticorps anti-CD3 ont été réalisés pour estimer le
20 nombre de TCR exprimés à la surface. Les résultats sont donnés sur les figures 4B (marquage CD3) et 4C (marquage du tétramère muté BMFL1/A2).

On constate que le ratio marquage tétramère/marquage CD3 est très comparable pour les deux
25 clones, ce qui indique que le marquage avec le tétramère muté est peu affecté par le degré de CD8 dépendance (et donc par inférence, par l'affinité du TCR).

Ainsi, la diminution d'affinité pour le CD8 induite par la mutation de la molécule HLA n'affecte pas
30 significativement le marquage spécifique du tétramère.

5

b) Détection de cellules spécifiques au sein d'une population polyclonale

Pour comparer la capacité de détection du tétramère natif et muté d'un faible pourcentage de cellules spécifiques au sein d'une population polyclonale, des lymphocytes périphériques de deux patients HLA-A0201 (désignés par A et B ci-après) ont été marqués. Il s'agit de patients chez lesquels une réponse anti-peptide pp65 du CMV avait été préalablement démontrée. Ces lymphocytes avaient été
10 préalablement amplifiés polyclonalement *in vitro* et congelés.

Les résultats obtenus pour les patients A et B sont reportés sur la figure 5, la figure 5A correspondant au patient A et la figure 5B au patient B. Il s'agit des résultats de simple marquage des tétramères HLA-A0201/pp65 à la phycoérythrine à 20µg/ml et des doubles marquages correspondants (tétramères marqués avec PE et des anticorps anti-CD8 marqués au FITC). Cette figure donne également les
20 moyennes d'intensité de fluorescence (log).

On constate tout d'abord que la capacité de discrimination du tétramère natif en simple marquage est variable en fonction du pourcentage de cellules spécifiques dans la population de départ. En effet, pour le patient A, le pic de cellules positives qui représente 5,60% est aisément identifiable tandis que pour le patient B, ce pic est
25 contaminé par du marquage non spécifique rendant difficile la détermination du pourcentage de cellules positives. En accord avec la littérature, le double marquage tétramère natif et anti-CD8 diminue le bruit de fond permettant alors
30

5 d'identifier clairement la sous-population positive et d'estimer précisément son pourcentage (0,84% dans ce cas). Ceci démontre donc que l'estimation précise du pourcentage de cellules positives avec le tétramère natif implique le recours au double marquage avec l'anti-CD8.

10 En revanche, le simple marquage avec le tétramère muté permet chez les deux patients d'identifier sans ambiguïté un pic de cellules positives. Les pourcentages de cellules positives obtenus sont quasiment identiques à ceux obtenus en double marquage avec le tétramère natif. Ceci
15 démontre que toutes les cellules spécifiques détectables par le tétramère natif le sont également avec le tétramère muté et corrobore donc les résultats obtenus avec les clones CD8 très dépendants et peu dépendants, à savoir que la mutation n'affecte pas significativement la reconnaissance spécifique.

20 De plus, ces résultats montrent que le double marquage avec le tétramère muté n'apporte pas d'éléments nouveaux par rapport au simple marquage. Enfin, on peut constater que les moyennes de fluorescence obtenues avec l'anticorps anti-CD8 lors du double marquage avec le
25 tétramère natif (216 et 193) pour les patients A et B) sont significativement plus faibles que celles obtenues en double marquage avec le tétramère muté (366 et 370 pour les patients A et B). Les moyennes de fluorescence obtenues après simple marquage de la population totale avec l'anti-CD8 étaient,
30 respectivement, de 340 et 355 pour les patients A et B. Cela démontre la compétition de fixation entre l'anticorps anti-CD8 et le tétramère natif, compétition qui ne se produit pas avec le tétramère muté.

5 L'utilisation du tétramère muté permet donc de se dispenser du double marquage avec l'anti-CD8 pour estimer le pourcentage de cellules spécifiques au sein d'une population polyclonale.

10 Exemple 3 : Etude comparative de l'efficacité et de la spécificité de tris immunomagnétiques réalisés avec le tétramère HLA-A0201 natif et le tétramère HLA-A0201 muté chargés avec le peptide p65.

15 Des monomères HLA-A0201 biotinylés et chargés en peptide pp65 ont été fixés sur des billes magnétiques couplées à la streptavidine (Dynabeads M-280 Streptavidin, DYNAL. Les populations lymphocytaires utilisées dans l'étude sont issues de liquides synoviaux ou de PBL de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de PBL issus de
20 donneurs sains séropositifs pour le CMV.

Sur la figure 6, sont indiqués les résultats d'un simple marquage avec le tétramère natif et le tétramère muté sur ces populations polyclonales. Avec le tétramère muté, il est possible de mettre en évidence un faible pourcentage de
25 cellules positives dans les deux prélèvements (0,22 % et 0,14 %), cellules positives qui ne sont quasiment pas identifiables avec le tétramère natif.

Ces populations ont été triées avec des billes chargées soit avec le tétramère natif, soit avec le tétramère
30 muté, puis les populations sélectionnées ont été amplifiées in vitro par une stimulation polyclonale (PHA, IL2, PBL irradiés), stimulation qui n'affecte pas la représentativité des populations amplifiées.

5 Un marquage a alors été réalisé sur ces populations triées et amplifiées avec les deux tétramères.

 Comme représenté sur la figure 6, les cellules issues du tri avec le tétramère natif sont positivement marquées avec ce même tétramère, mais en revanche un très
10 faible pourcentage de ces cellules sont positives avec le tétramère muté (0,7 % et 2,88 %).

 Les résultats sont remarquablement différents après un tri avec le tétramère muté puisque les populations triées sont fortement positives avec les deux tétramères.

15 Le facteur d'enrichissement en cellules positives obtenu avec le tétramère muté est de 421 pour le prélèvement 1 (92,64 % vs 0,22 %) et de 693 pour le prélèvement 2 (97,01 % vs 0,14 %).

 Ces résultats montrent qu'en effectuant un tri avec
20 le tétramère muté, il est possible d'obtenir une population positive pure à plus de 90 % à partir d'un échantillon dans lequel cette population représente 0,1 à 0,2 %.

 La généralité de cette observation est illustrée par le tableau ci-après, qui décrit les résultats de tris
25 effectués avec le tétramère natif et le tétramère muté à partir de PBL et lymphocytes synoviaux de patients et donneurs sains.

% de cellules positives de tétramères (facteur d'enrichissement)

Echantillons	non triés	Premier tri avec		Second tri avec	
		A2/pp65 native	A2/pp65 muté	A2/pp65 native	A2/pp65 muté
SFL 1	14,0	95,0 (6,8)			
PBL 1	5,6	89,5 (16,0)	97,9 (17,5)		
SFL 2	1,4	25,3 (18,1)		75,9 (3,0)	
PBL 2	0,8	51,1 (63,9)	97,5 (121,9)		
SFL 3	0,6	13,7 (22,8)			
PBL 3	nd	8,5 (nd)		12,0 (1,4)	
SFL 4	0,3	4,1 (13,6)		8,6 (2,1)	
SFL 5	0,2	0,7 (3,5)	92,5 (462,5)		
SFL 6	0,14	2,9 (20,6)	97,1 (693,6)		
PBL 4	0,09		82,9 (921,1)		
PBL 5	0,02	0,04 (2,0)	2,2 (110,0)	98,7 (44,90)	

5

En effectuant des tris répétés avec le tétramère muté, il est possible d'obtenir des populations spécifiques pures à partir de sous-populations encore moins fréquentes (cf PBL5 dans le tableau). En revanche, ce résultat est
10 beaucoup plus difficile à obtenir avec le tétramère natif; il semble en effet que les cellules non spécifiques isolées par un premier tri avec le tétramère natif aient une affinité suffisante pour être à nouveau sélectionnées lors des tris ultérieurs. On aboutit donc à des facteurs d'enrichissement
15 très médiocres en réalisant un deuxième tri (cf PBL3 et SFL4).

Une autre étude a porté sur la réactivité des populations triées pour vérifier que les cellules
20 sélectionnées pour leur capacité à fixer le tétramère A2 muté/pp65 étaient bien réactives vis-à-vis de ce complexe HLA-peptide dans un contexte physiologique.

A cet effet, on a étudié l'activation des populations lymphocytaires triées, objectivées par
25 l'induction à la surface de la chaîne α du récepteur à l'IL2 (CD25), après mise en présence de cellules T2 (A0201+) chargées en peptide pp65.

Comme le montre la figure 7, les populations triées à l'aide du tétramère natif n'expriment pas le CD25 après
30 contact avec les cellules T2 chargées en peptides.

5 En revanche, la majorité des cellules triées avec le tétramère muté s'activent en présence de T2 chargées avec le peptide pp65 et le pourcentage de cellules positives en CD25 correspond bien avec le pourcentage de cellules qui étaient marquées par le tétramère muté (90,63 % de cellules
10 activées vs 92,64 % de cellules marquées et 97,20 % vs 97,01 % pour les patients 1 et 2 respectivement).

 Ces résultats démontrent que les cellules marquées et triées avec le tétramère muté sont exclusivement des cellules réactives, tandis que les cellules triées avec le
15 tétramère natif sont non réactives.

 Le fait qu'on ne retrouve aucune cellule réactive après tri avec le tétramère natif alors qu'on parvenait à distinguer quelques cellules positives dans cette population est vraisemblablement dû au pourcentage trop faible de ces
20 cellules pour être détectables dans un test fonctionnel.

 L'ensemble de ces résultats démontre la supériorité manifeste du tétramère muté par rapport au tétramère natif pour sélectionner par tri immunomagnétique des populations faiblement représentées dans la population de départ.

25 Lorsque les populations spécifiques sont plus nombreuses dans le prélèvement de départ, il devient alors possible d'isoler des cellules réactives avec le tétramère natif, mais les degrés de pureté des populations obtenues sont très inférieurs à ceux obtenus en parallèle avec le
30 tétramère muté (tableau).

5

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Altman J.D. et al, 1996, Science 274:94-6 et
brevet US 5 635 363
- 2) Salter, R.D. et al, 1990, Nature 345:41-46
- 10 (3) Garboczi D.N. et al, 1992, Proc Natl Acad Sci
USA 89:3429-33
- 4) Couedel, C., M. et al, 1999, J. Immunol 162-
6351-8.
- 5) Luxembourg A.T. et al, Nature Biotechnology, vol
15 16, mars 1998, 281-285.

5

REVENDICATIONS

1/ Multimères élaborés à partir de protéines recombinantes analogues de CMH de classe I, caractérisés en ce que les protéines comportent au moins une altération dans la zone d'interaction d'une chaîne lourde avec le co-récepteur CD8 des lymphocytes T conduisant à une réduction, voire à la suppression de l'affinité de l'interaction entre la chaîne lourde et le CD8.

2/ Multimères selon la revendication 1, caractérisés en ce que l'altération concerne le domaine $\alpha 3$ de la chaîne lourde.

3/ Multimères selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que l'altération correspond à une mutation dans le domaine $\alpha 3$ d'au moins un acide aminé, par rapport au domaine correspondant, d'une chaîne lourde native capable de se fixer audit co-récepteur CD8.

4/ Multimères selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que l'altération correspond à la modification chimique d'au moins un acide aminé du domaine $\alpha 3$ d'une chaîne lourde, par rapport au domaine correspondant d'une chaîne lourde native capable de se fixer audit co-récepteur CD8.

5/ Multimères selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que l'altération correspond à la délétion d'au moins un acide aminé du domaine $\alpha 3$ d'une chaîne lourde, par rapport au domaine correspondant d'une chaîne lourde native capable de se fixer audit co-récepteur CD8.

5 6/ Multimères selon l'une quelconque des
revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'ils se présentent
sous forme de complexes avec des peptides antigéniques.

 7/ Multimères selon la revendication 6,
caractérisés en ce qu'ils se présentent sous forme de
10 tétramères.

 8/ Utilisation des multimères selon la
revendication 6 Ou 7 à des fins de détection et/ou
d'isolement de populations lymphocytaires T CD8+ peptides-
spécifiques.

15 9/ Utilisation selon la revendication 8 dans un
procédé de tri cellulaire, tel que le tri immunomagnétique.

 10/ Méthode de détection de populations
lymphocytaires T CD8+ peptide-spécifiques, à partir d'une
population polyclonale, caractérisée en ce qu'elle comprend :
20 - la mise en contact de la population polyclonale avec des
multimères complexés à des peptides antigéniques selon la
revendication 6 ou 7, dans des conditions permettant une
interaction entre les complexes de CMH de classe I
altérés/peptides et les récepteurs des lymphocytes T ayant
25 une affinité pour lesdits complexes,

 - la révélation des populations lymphocytaires qui
se sont fixées auxdits complexes.

 11/ Méthode d'isolement de populations
lymphocytaires T CD8+ peptide-spécifiques, à partir d'une
30 population polyclonale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

 - la mise en contact de la population polyclonale
avec des billes magnétiques sur lesquelles sont fixées les
complexes peptide/analogues de CMH de classe I selon la

5 revendication 6 ou 7, dans des conditions permettant une interaction entre lesdits complexes et les récepteurs des lymphocytes T ayant une affinité pour lesdits complexes,

- la récupération des populations fixées, l'opération de tri étant répétée, si souhaité, et/ou suivie,
10 le cas échéant, d'une étape

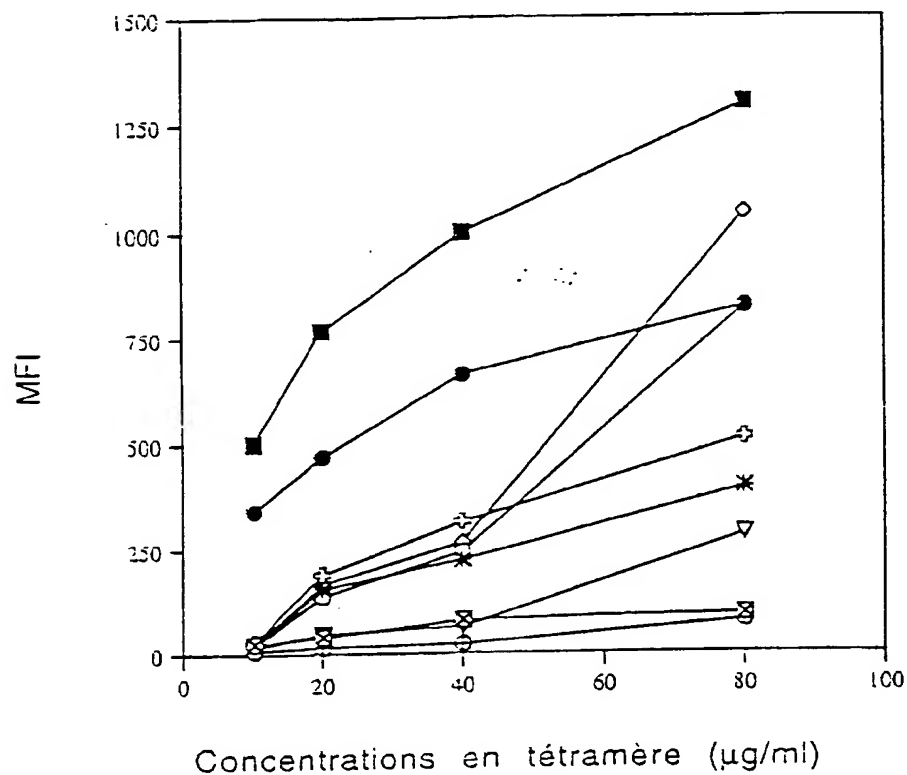
- d'amplification *in vitro* des populations sélectionnées.

12/ Populations lymphocytaires sélectionnées, et le cas échéant amplifiées, caractérisées en ce qu'elles sont
15 exclusivement constituées de lymphocytes T réactifs vis-à-vis du peptide d'un complexe avec des multimères selon la revendication 6 ou 7.

13/ Compositions pharmaceutiques, utilisables notamment en immunothérapie, caractérisées en ce qu'elles
20 sont élaborées à partir d'une population lymphocytaire selon la revendication 12 en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte.

Figure 1A

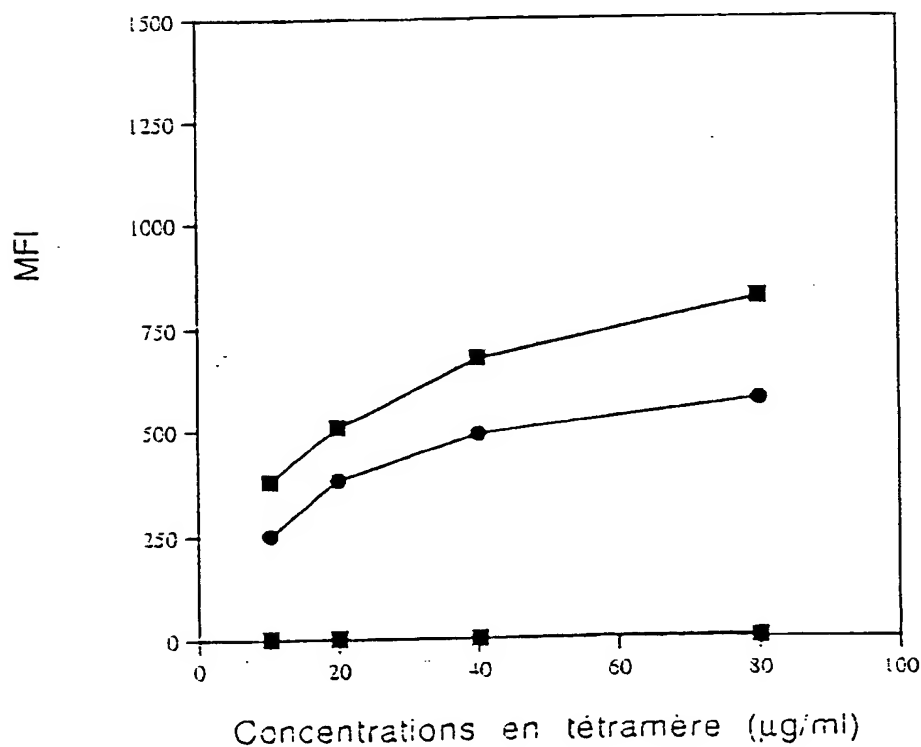
Tétramère HLA-A2/BMLF1



- A2.10 BM/A2
- A4.5 BM/A2
- LP16 IE1/A2
- ◇— LP23 IE1/A2
- ▽— Melan-A/A2
- ◊— BZ/B13
- *— BZ/B14
- ⊙— Tyrosinase/B35
- ⊠— 22.19 BZ/B40

Figure 1 B

Tétramère HLA-A2 muté/BMLF1



TETRAMERES HLA-A2/pp65

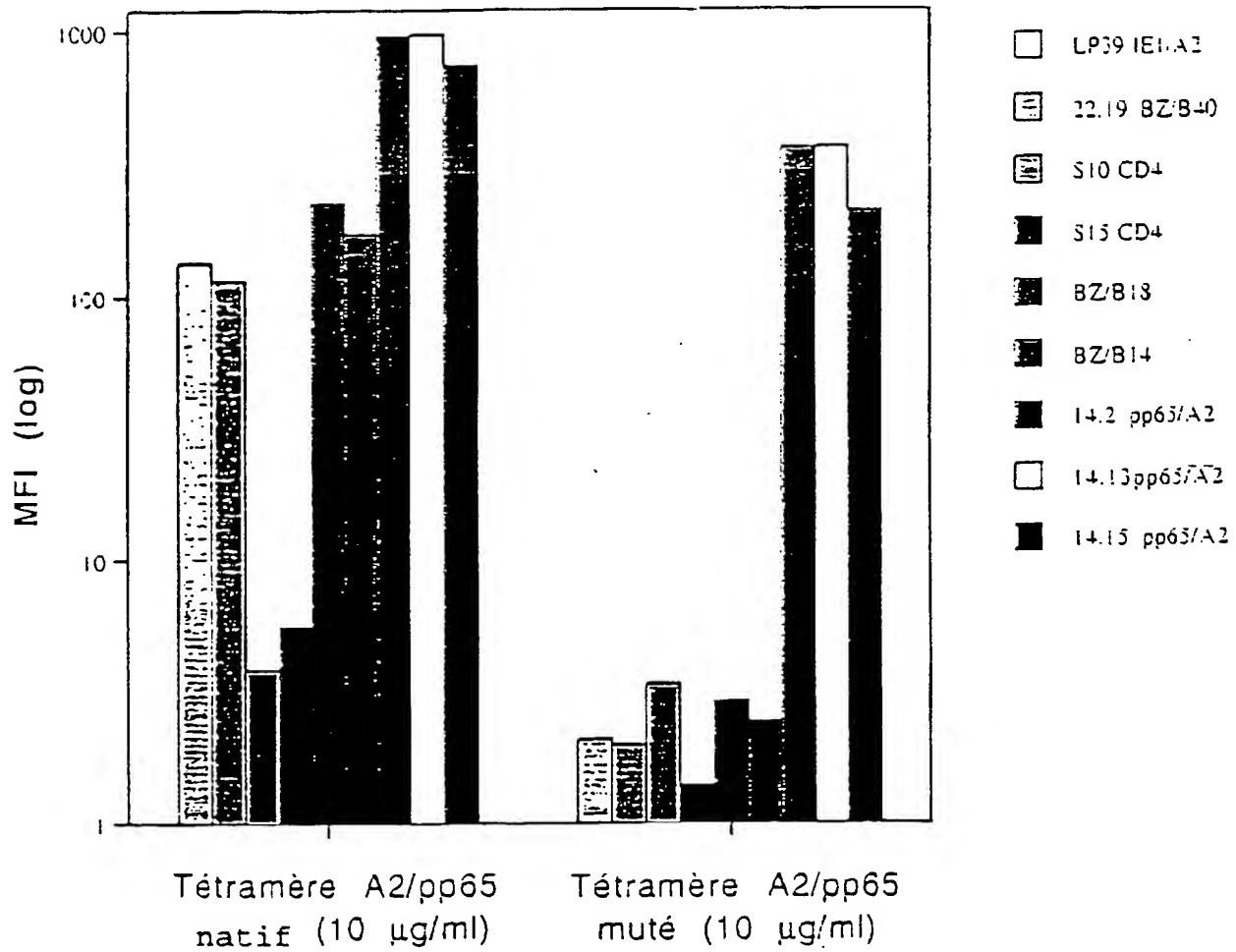
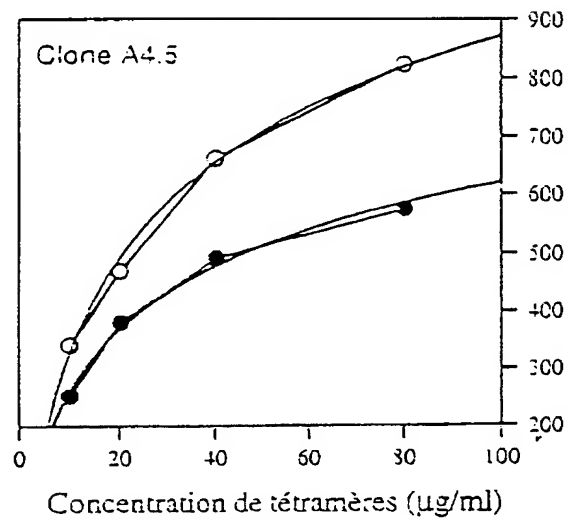
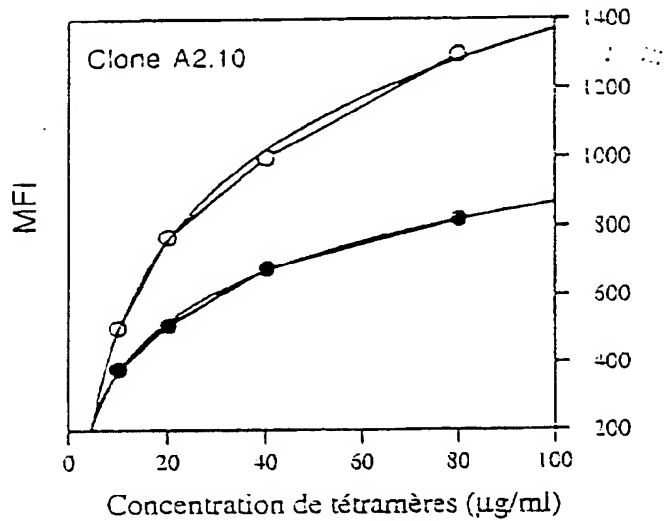


Figure 2A

Figure 2B

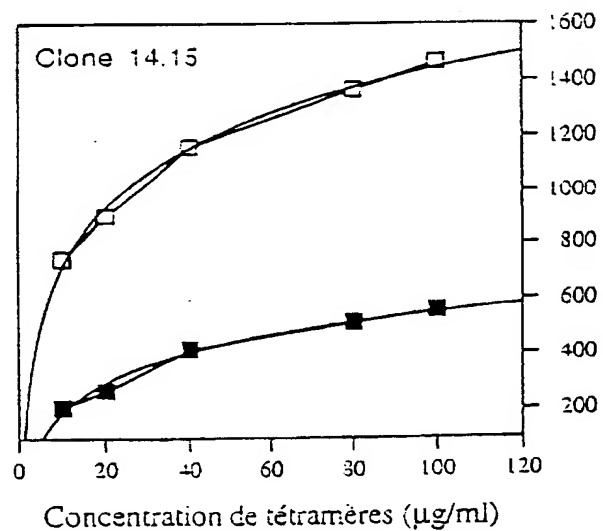
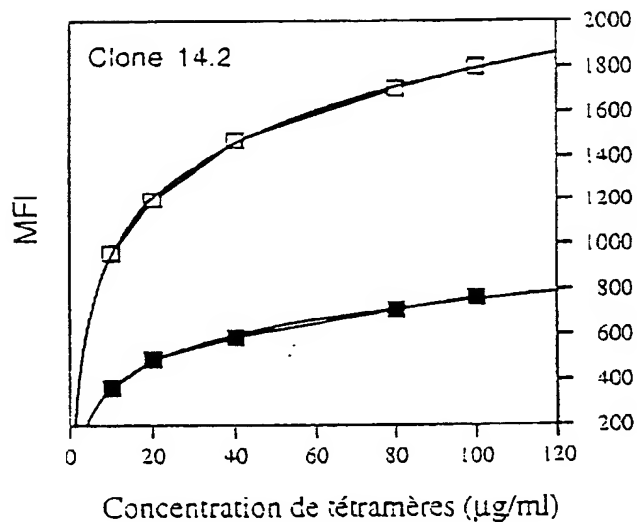
—○— tétramère BM/A2 natif

—●— Tétramère BM/A2 muté



—□— tétramère pp65/A2 natif

—■— tétramère pp65/A2 muté



4/7

Figure 4A

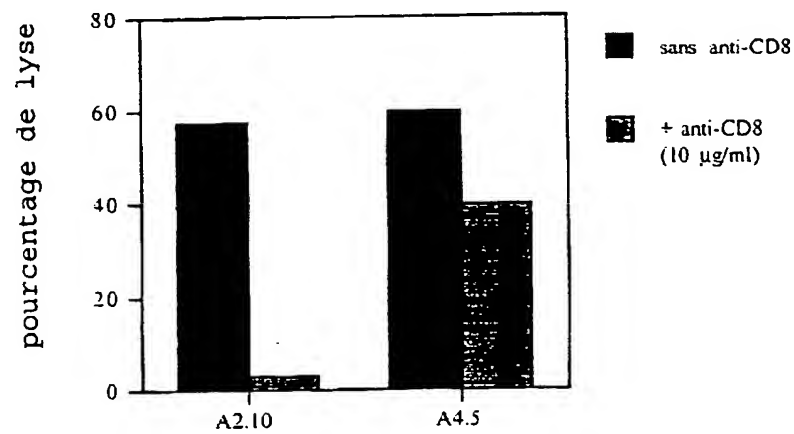


Figure 4B

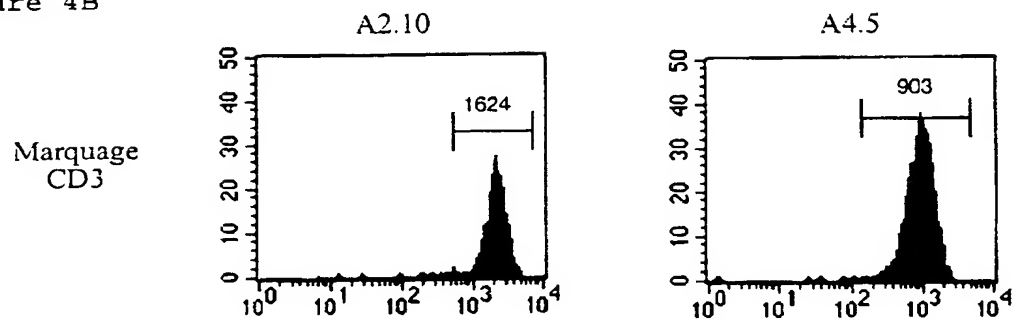
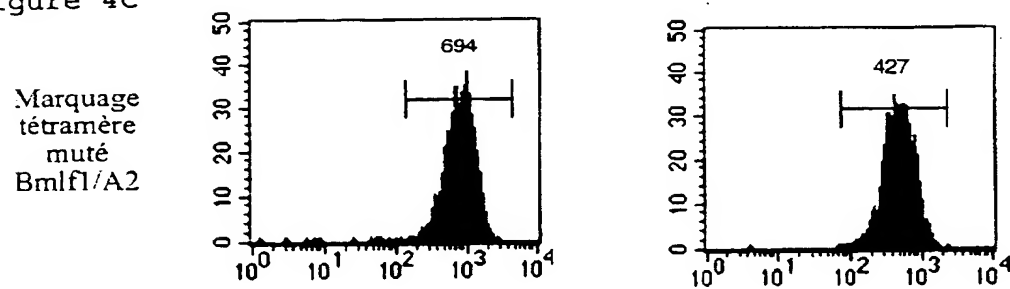


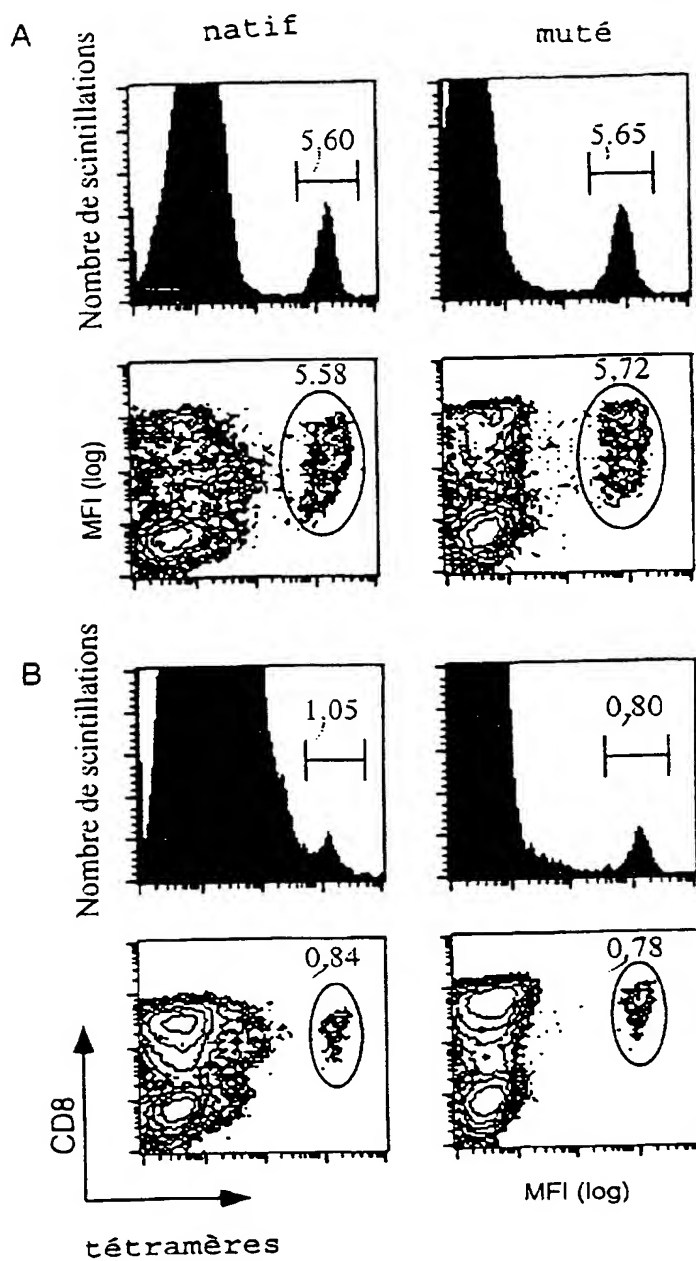
Figure 4C



Ratio MFI tétramère muté/MFI CD3:

A2.10 : 0,43

A4.5 : 0,47

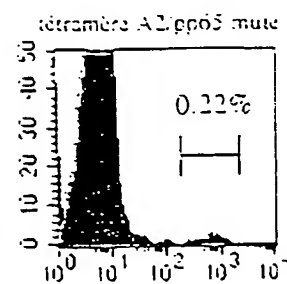
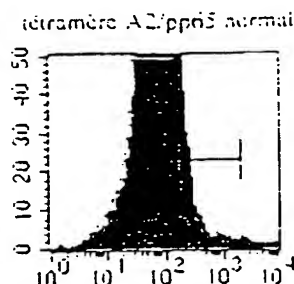
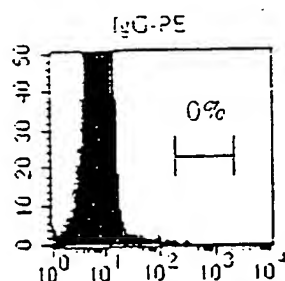


Marquage avant tri

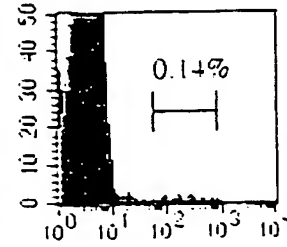
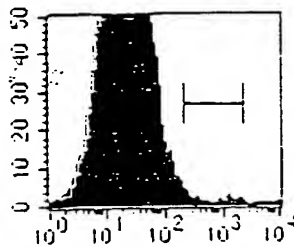
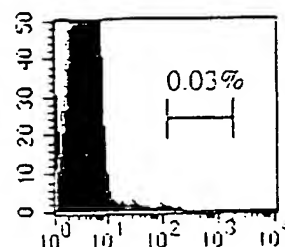
6/7

2798128

Patient 1

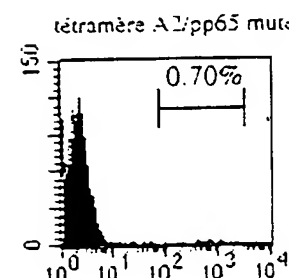
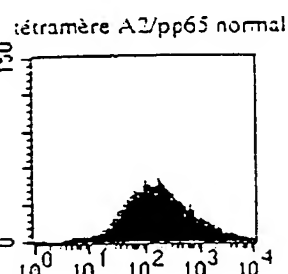
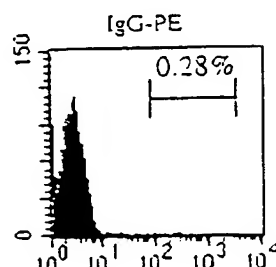


Patient 2

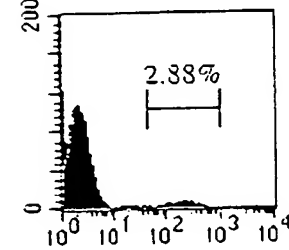
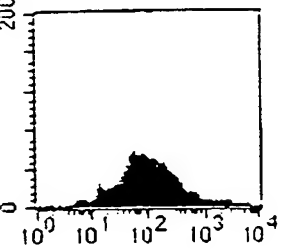
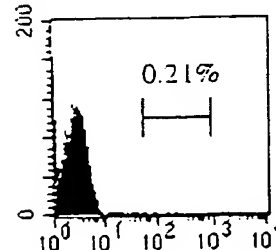


Marquage après tri avec le tétramère A2/pp65 normal

Patient 1

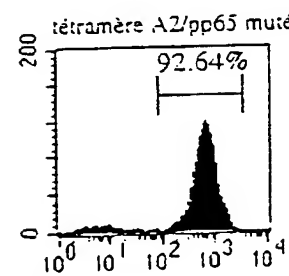
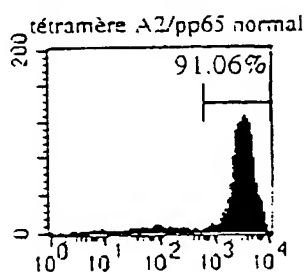
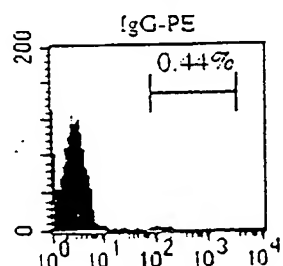


Patient 2

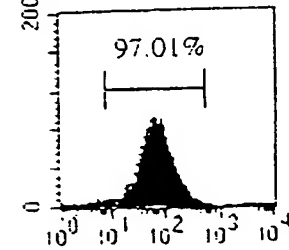
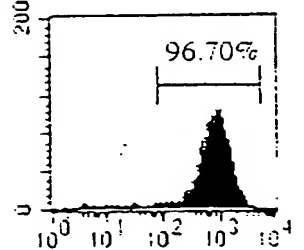
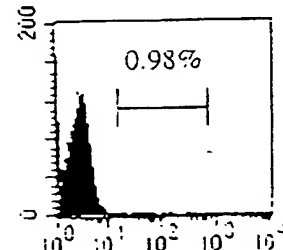


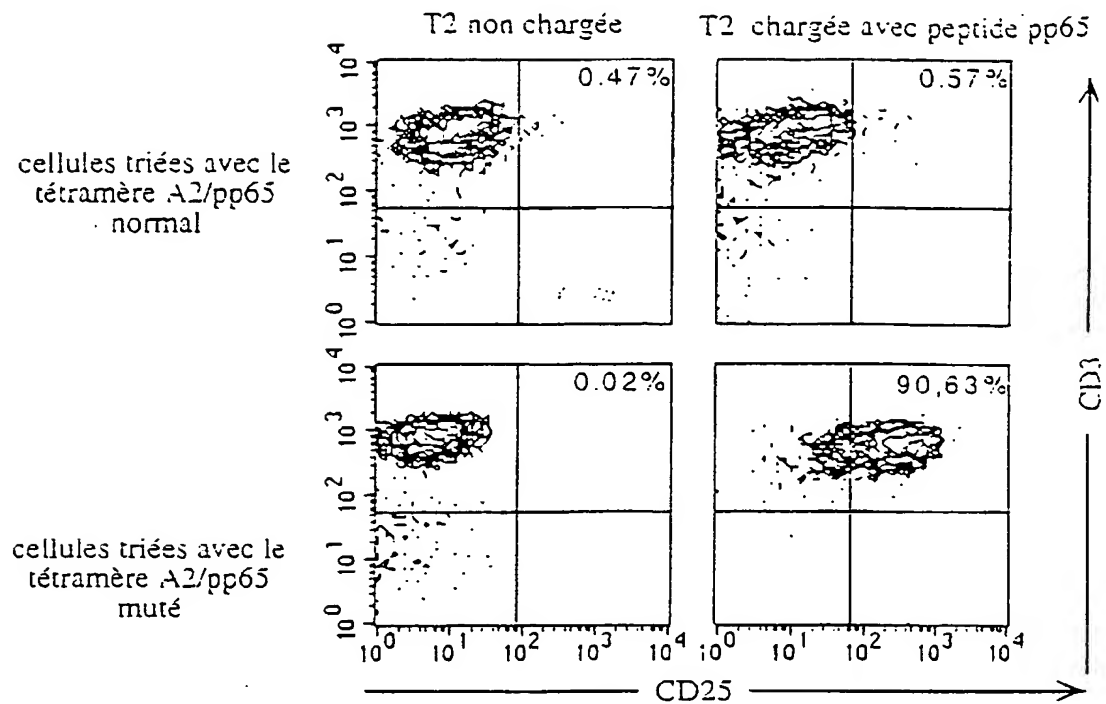
Marquage après tri avec le tétramère A2/pp65 muté

Patient 1

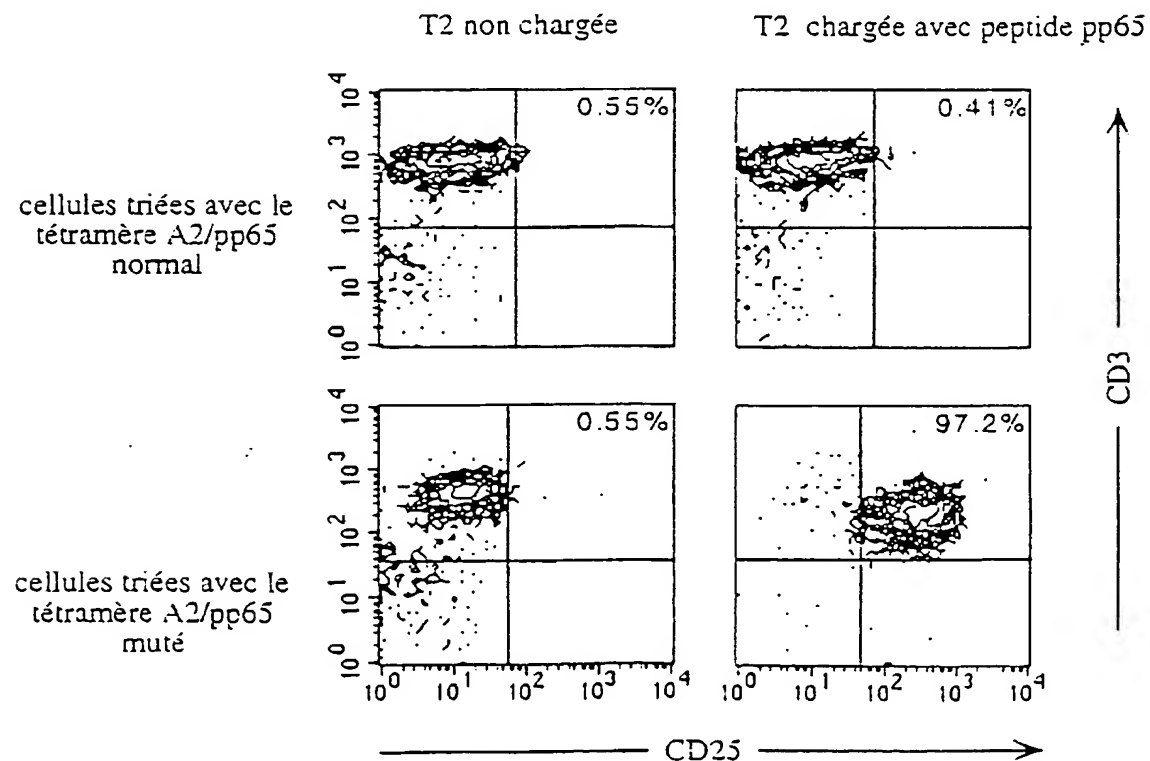


Patient 2





Patient 2



1
LISTE DE SEQUENCES

<110> I. N. S. E. R. M.

<120> MOYENS DE DETECTION ET DE PURIFICATION DE POPULATIONS
LYMPHOCYTAIRES TCD8+, SPECIFIQUES DE PEPTIDES PRESENTES
DANS LE CONTEXTE HLA.

<130> CP/VB/992FR99

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: région
homologue à une partie du gène HLA-A0201 humain.

<400> 1

ccttccagaa gtgggtggct gtggtggtgc c

31

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: région
homologue à une partie du gène HLA-A0201 humain.

<400> 2

ggcaccacca cagccacca cttctggaag g

31

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 580370
FR 9911133

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 99 11775 A (GEN HOSPITAL CORP ; HARVARD COLLEGE (US); GARBOCZI DAVID N (US); WA) 11 mars 1999 (1999-03-11) * page 24, ligne 4 - ligne 20; revendications; exemples *	1,8, 10-13
A	WO 97 44667 A (INST NAT SANTE RECH MED ; LANGLADE DEMOYEN PIERRE (FR); LONE YU CHU) 27 novembre 1997 (1997-11-27) * revendications; exemples *	1,8, 10-13
D,A	WO 96 26962 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 6 septembre 1996 (1996-09-06) * revendications; exemples *	1,8, 10-13
D,A	R.D. SALTER ET AL.: "A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha3 domain of HLA-A2" NATURE, vol. 345, 3 mai 1990 (1990-05-03), pages 41-46, XP002137488 LONDON GB * page 44, colonne de droite, alinéa 3 - page 46, colonne de droite, dernier alinéa; figure 1 *	1,8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		C07K G01N C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
11 mai 2000		Fuhr, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

Figure 1A

Tétramère HLA-A2/BMLF1

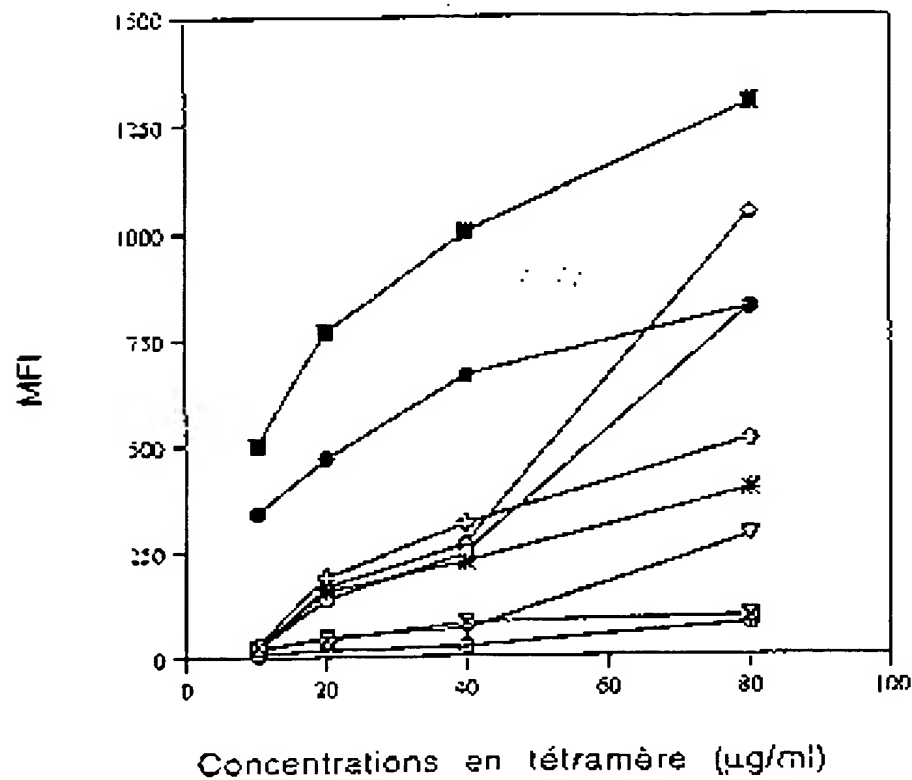
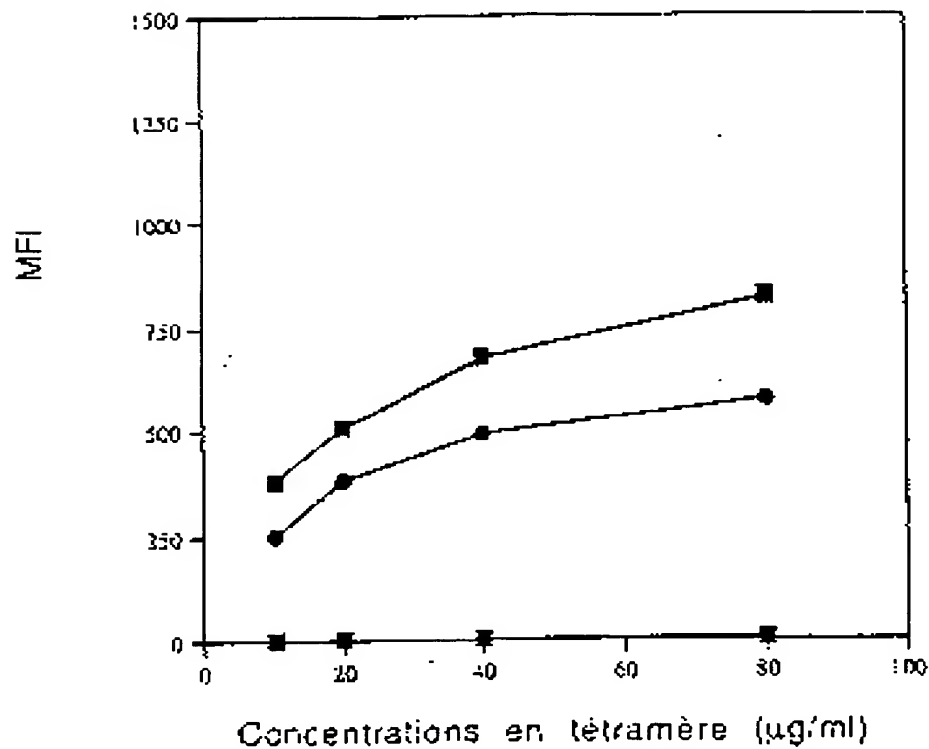


Figure 1 B

Tétramère HLA-A2 muté/BMLF1



TETRAMÈRES HLA-A2/pp65

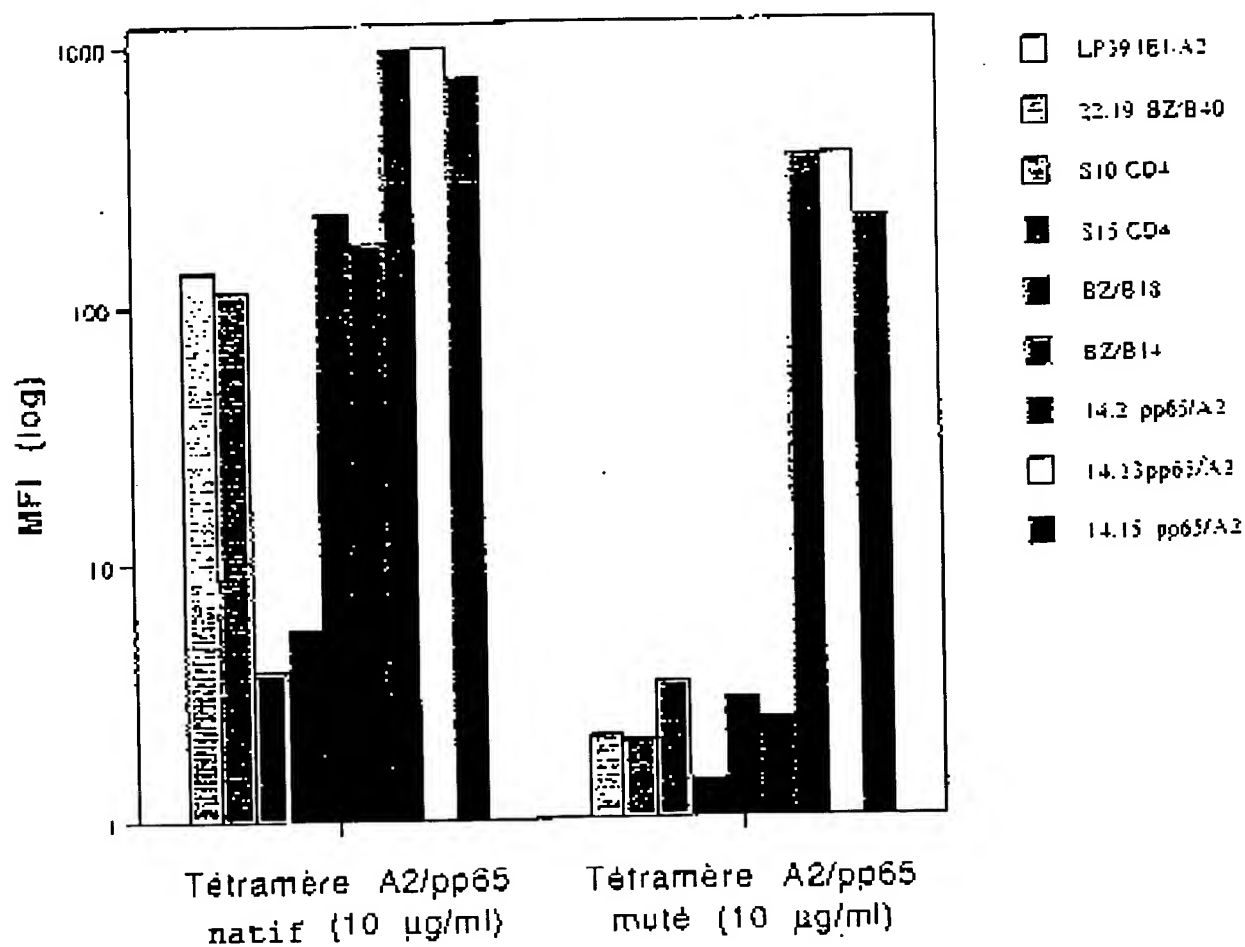
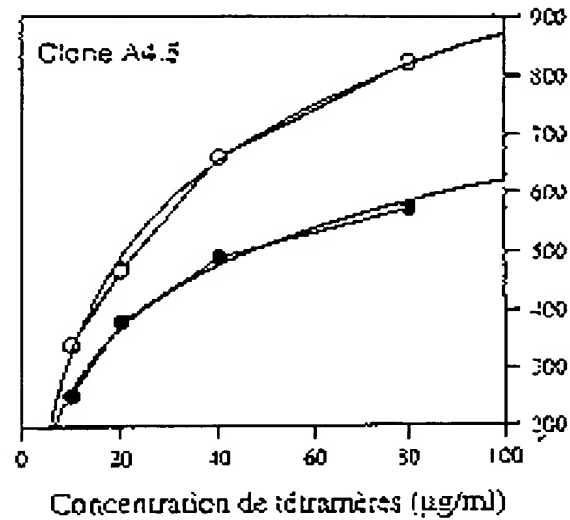
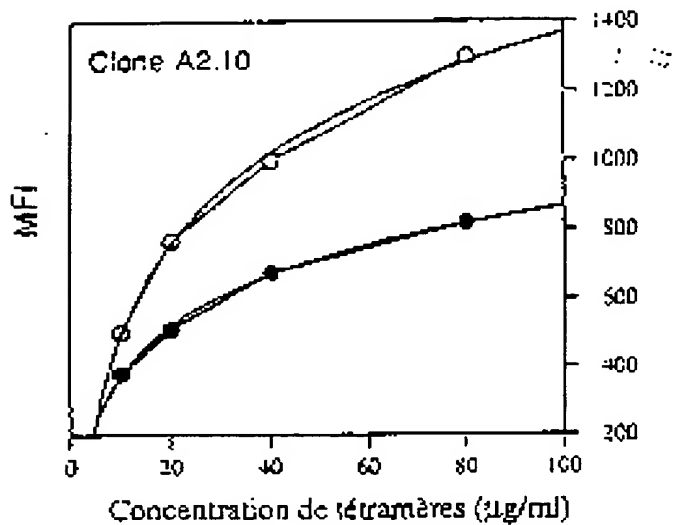


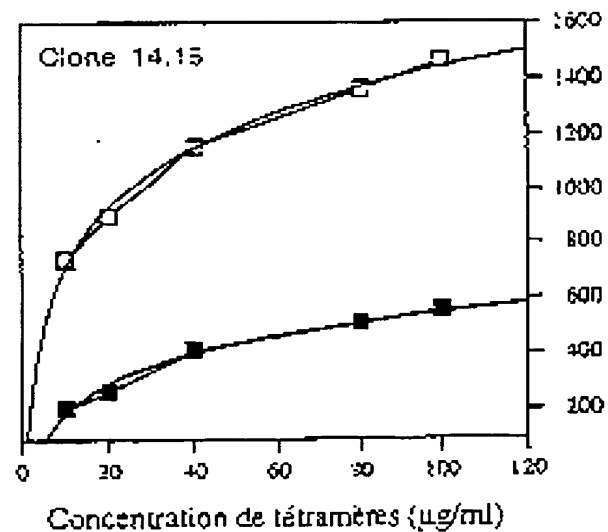
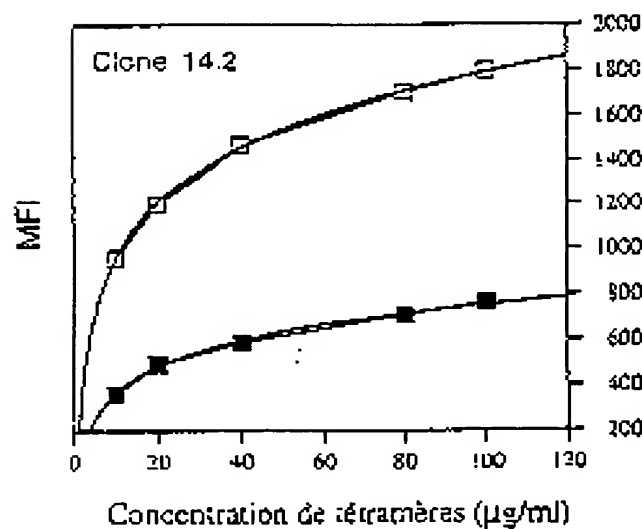
Figure 2A

Figure 2B

—○— tétramère BM/A2 natif
 —●— tétramère BM/A2 muté



—□— tétramère pp65/A2 natif
 —■— tétramère pp65/A2 muté



4/7

Figure 4A

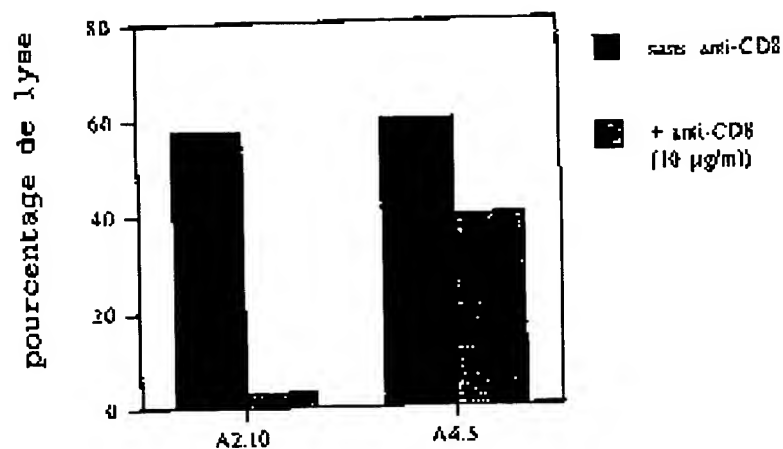


Figure 4B

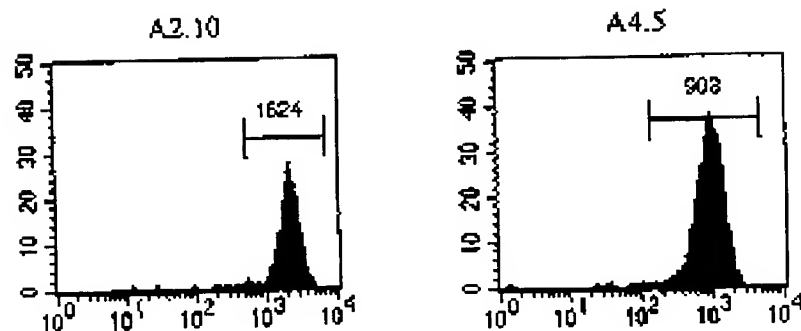
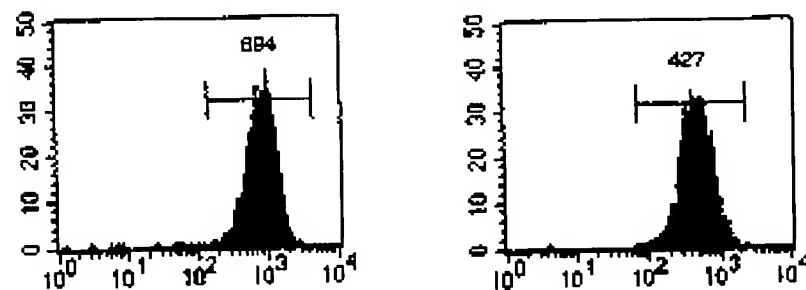
Marquage
CD3

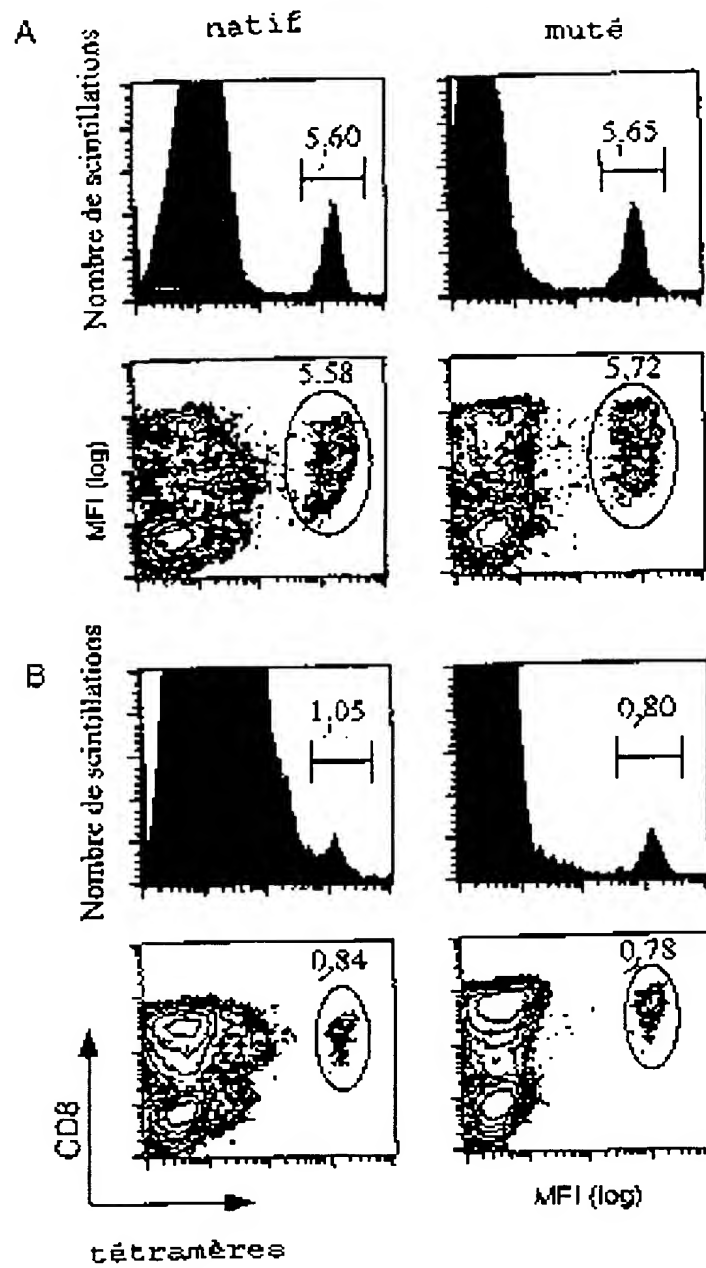
Figure 4C

Marquage
tétramère
muté
BmtII/A2

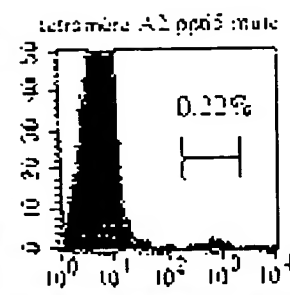
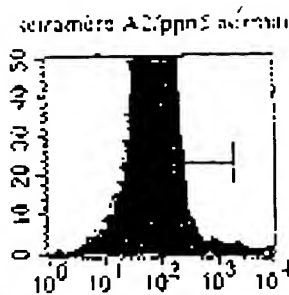
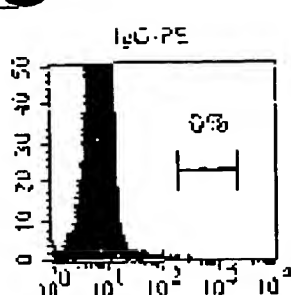
Ratio MFI tétramère muté/MFI CD3:

A2.10 : 0,43

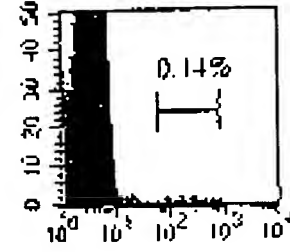
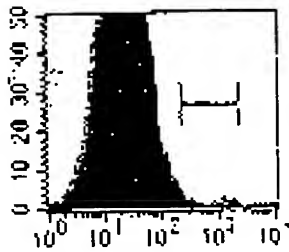
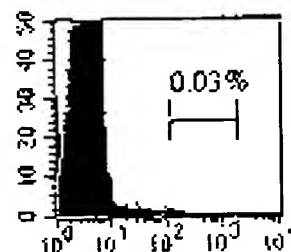
A4.5 : 0,47



Patient 1

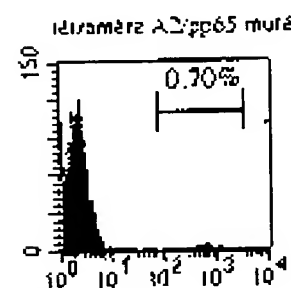
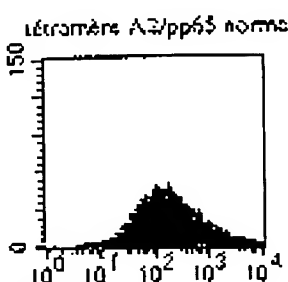
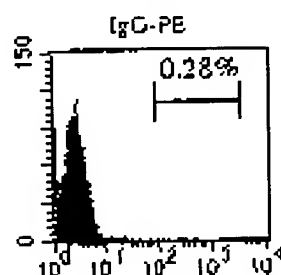


Patient 2

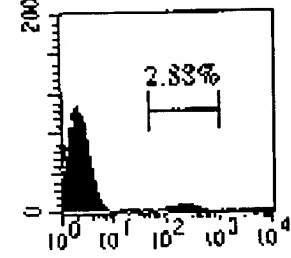
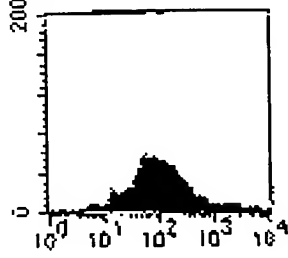
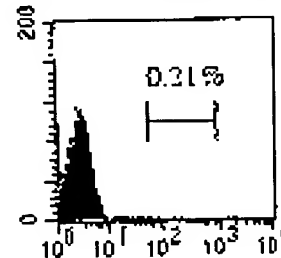


Marquage après tri avec le tétramère A2/pp65 normal

Patient 1

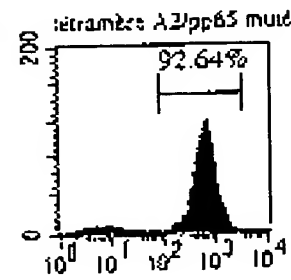
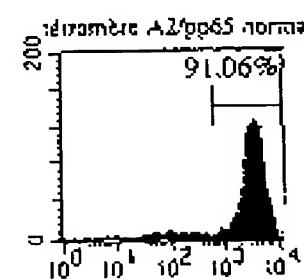
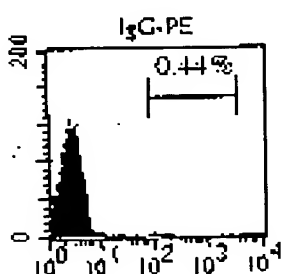


Patient 2

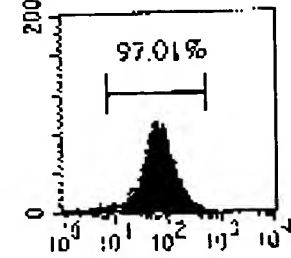
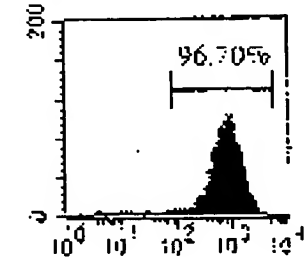
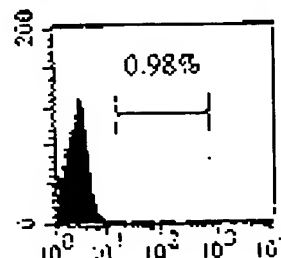


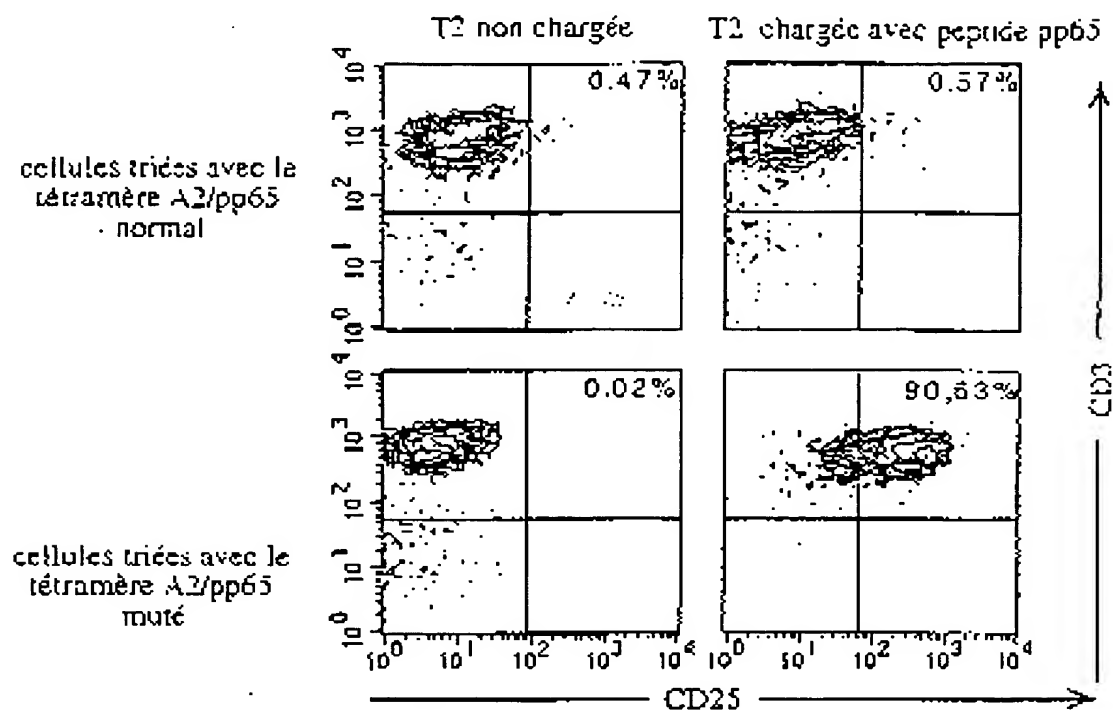
Marquage après tri avec le tétramère A2/pp65 muté

Patient 1

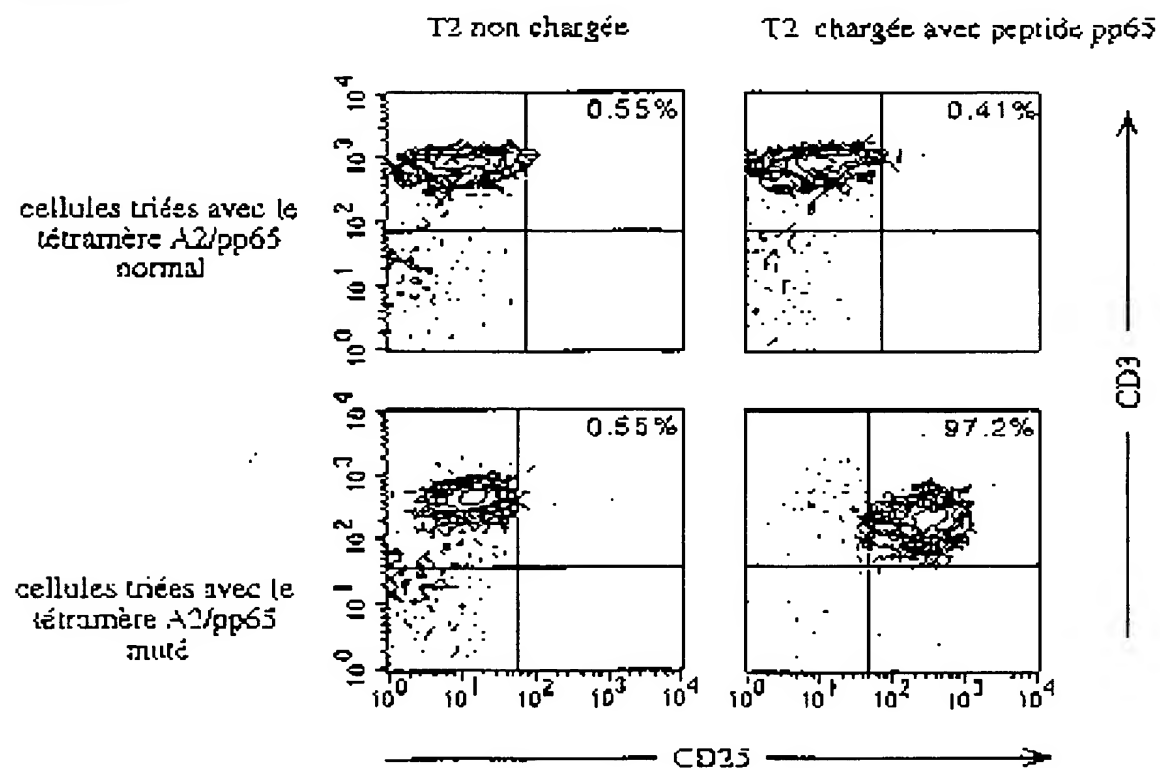


Patient 2





Patient 2



1
LISTE DE SEQUENCES

<110> I. N. S. E. R. M.

<120> MOYENS DE DETECTION ET DE PURIFICATION DE POPULATIONS
LYMPHOCYTAIRES TCD8+, SPECIFIQUES DE PEPTIDES PRESENTES
DANS LE CONTEXTE HLA.

<130> CP/VE/9926R99

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vec. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: région
homologue à une partie du gène HLA-A0201 humain.

<400> 1

cttccagaa gtgggtgact gtgggtgggc c

31

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: région
homologue à une partie du gène HLA-A0201 humain.

<400> 2

ggcaccacca cagccacca cttctggaa g

31